

# КАК ОБЕСПЕЧИТЬ ТРЕБУЕМУЮ ТОЧНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ



ОВАНЕСОВ  
Евгений  
Николаевич

исследование концентрации гемоглобина крови является одним из наиболее массовых и клинически важных лабораторных исследований. Известно, что суточная вариация этого параметра может достигать у человека 2%.

Нормы точности, предъявляемые к лабораторному исследованию гемоглобина, определены Приказом Минздрава РФ №45 от 07.02.2000 г. Предельно допустимые значения смещения (B) и коэффициента общей аналитической вариации (CV), рассчитанные по результатам 20 измерений определяемого показателя в контрольном материале гемоглобина, составляют 4% и 4% соответственно. Этим же приказом определены биологически обоснованные нормы аналитической точности клинических лабораторных исследований концентрации гемоглобина в крови: B(20) – 2,5%, CV(20) – 2,3%.

Достижение такой точности, требует тщательного проведения измерений, анализа и устранения всех источников ошибок. В общем случае ошибки можно разделить на ошибки метода, ошибки пробоподготовки и ошибки измерений, то есть приборные ошибки.

Наиболее массовыми, рутинными методами исследования гемоглобина крови являются фотометрические методы, использующие свойство гемоглобина и его производных хорошо растворяться в воде, окрашивая раствор характерным цветом. Ниже рассмотрены методы, в которых для фотометрирования используются растворы гемиглобинцианида (гемиглобинцианидный метод), гемихрома (гемихромный метод) или разведение производных гемоглобина крови в 0,04% растворе аммиака (модифицированный метод Дервиза-Воробьева). Все три метода рекомендованы Минздравом России для использования в медицинской практике.

Сущность методов проста – с помощью трансформирующих растворов из цельной крови приготавливается биопроба, которая фотометрируется, и по измеренной оптической плотности определяется концентрация гемоглобина:

$$C_{\text{Hb}} (\text{г/л}) = (A^{\lambda}_{\text{пробы}} \times F \times 10)/L \quad (1)$$

где  $A^{\lambda}_{\text{пробы}}$  – оптическая плотность раствора на рабочей длине волн  $\lambda$  нм; F – коэффициент (фактор) пересчета оптической плотности в концентрацию, 10 – толщина "идеальной" спектрофотометрической кюветы, L – истинная длина кюветы.

Для гемиглобинцианида фактор является известной величиной и равен 367,7 ( $\lambda=540$  нм). Для гемихромного метода фактор равен 398,0 ( $\lambda=540$  нм).

Обратим внимание, что, величина фактора определена для монохроматического измерения, когда спектральная полоса составляет  $\Delta\lambda \approx 1$  нм. Такая полоса достигается только в спектрофотометрах.

Содержание гемоглобина можно определить и по формуле (2):

$$C_{\text{Hb}} (\text{г/л}) = C_{\text{калибратора}} (A^{\lambda}_{\text{пробы}} / A^{\lambda}_{\text{калибратора}}) \quad (2)$$

где  $C_{\text{калибратора}}$  – концентрация гемоглобина в калибровочном

растворе, который прилагается, как правило, к трансформирующему реагенту;  $A^{\lambda}_{\text{пробы}}$  – оптическая плотность пробы;  $A^{\lambda}_{\text{калибратора}}$  – оптическая плотность калибратора.

Оптимальной областью фотометрирования является максимум спектральной кривой поглощения. Для гемиглобинцианида – это 540 нм (рис. 1), которая и есть рабочая длина волны для этого метода. Измерение в максимуме кривой, где смягчаются требования к точности установки длины волны, снижает требования к точности изготовления и стабильности полосовых фильтров. Максимум кривой поглощения гемихрома находится на длине волны 533 нм (рис. 1). Однако измерение на этой длине волны возможно только в спектрофотометрах. В специализированных фотометрах применяются полосовые светофильтры с типовыми длинами волн. Ближайшая к 533 нм типовая длина волны – 540 нм, на которой и проводится фотометрирование с учетом коэффициента пересчета для 540 нм.

Для модифицированного метода Дервиза-Воробьева оптимальной (рабочей) является изобестическая точка 523 нм, в которой минимизируются ошибки измерений (рис. 2).

## Ошибки методов

К ошибкам метода мы относим ошибки связанные с оптическими свойствами биопробы, способами подготовки биопробы, а также способами (оптическими схемами) фотометрирования.

## Преобразование и спектры поглощения производных гемоглобина

В крови гемоглобин существует в четырех основных формах: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, карбоксигемоглобин и метгемоглобин. Производные гемоглобина имеют характерные спектры поглощения (рис. 2).

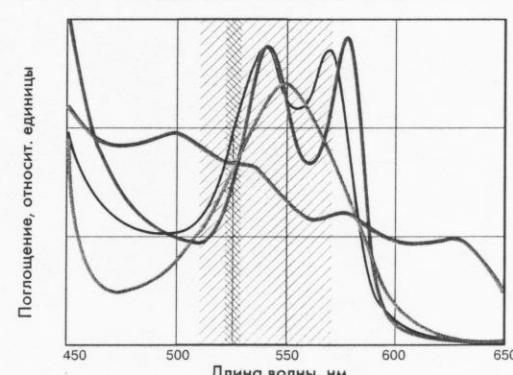


Рисунок 2. Спектры поглощения производных гемоглобина.

Фотометрирование непосредственно крови затруднительно по следующим причинам:

Гемоглобин в крови не свободен, а находится в эритроцитах. Наличие клеток и белков приводит к значительному рассеянию света и оптические свойства крови не подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера, который устанавливает прямо пропорциональную зависимость между поглощением светового потока определенной длины волны и концентрацией растворенного вещества.

Концентрация гемоглобина в крови высока, поэтому для достижения оптимальной плотности фотометрирования 0,5 Б (Белл) (практически все фотометры работают при плотности биопроб 0,2-1 Б) требуется оптическая кювета с длиной оптического пути 50 микрометров. Изготовить такую кювету с необходимой точностью и поместить в нее кровь проблематично. Так как производные гемоглобина имеют различающиеся спектральные кривые поглощения, результат фотометрирования зависит от соотношения производных, которое в общем случае неизвестно.

Из сказанного вытекают следующие требования к пробе крови: Она должна иметь окраску и быть прозрачной.

Оптическая плотность пробы в стандартных спектрофотометрических кюветах (10 мм) должна быть в пределах 0,2-1 Белл. Проба должна иметь одну производную Нв с удобным для фотометрирования спектром поглощения или способ фотометрирования должен учитывать поглощение разных форм Нв. Однако существуют особенности, которые также необходимо учитывать при фотометрировании биопроб. Так, в случае спектральной зависимости поглощения, закон Бугера-Ламберта-Бера справедлив только при фотометрировании растворов в монохроматическом свете. Если оптическая схема содержит светофильтр с широкой полосой пропускания, то линейная зависимость результата измерения от концентрации вещества нарушается. На рис. 3 показана связь между полосой пропускания светофильтра и величиной нелинейности для растворов гемоглобинцианида и гемихрома.

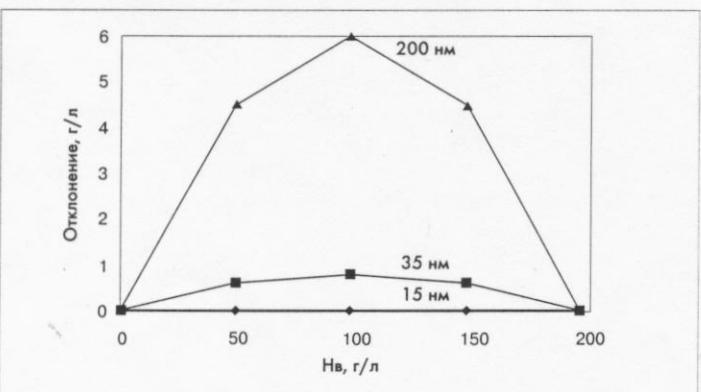


Рисунок 3. Зависимость нелинейности измерений от ширины полосы пропускания (методическая ошибка).

Для светофильтров с полосой пропускания 200 нм (зеленое стекло 3С-1) нелинейность (ошибка) достигает 6%. Такие светофильтры имеют старые ФЭК и поэтому их необходимо калибровать с помощью калибровочных растворов. Современные колориметры и специальные фотометры – гемоглобинометры содержат узкополосные светофильтры с полосой пропускания менее 40 нм, которые обеспечивают нелинейность меньше процента. В таких приборах в некоторых случаях можно обойтись без калибровки. Так гемоглобинометры "МиниГЕМ" с узкополосным светофильтром калибруются лишь однажды на заводе, а в процессе эксплуатации их оптические параметры контролируются и

корректируются не по калибровочным растворам, а по стеклянной оптической мере, которая имеет стабильные оптические характеристики. Это упрощает и удешевляет стоимость исследований и, в то же время, повышает точность измерений.

Ширина полосы пропускания оказывает влияние на величину ошибки измерения и в другом случае. В прошлом был широко распространен метод, основанный на фотометрировании разведения крови в слабом (0,04%) растворе амиака. На рис. 3 приведены спектры поглощения производных гемоглобина в таком разведении. В случае использования в оптической схеме фотометра светофильтра с широкой полосой пропускания, например из цветного стекла (широкая заштрихованная область на рис. 2), и при наличии существенного количества метгемоглобина и карбоксигемоглобина ошибка измерения может достигать 30%, что абсолютно неприемлемо.

Рассмотрим, однако, случай фотометрирования в узкой спектральной полосе с центром на длине 523 нм (узкая заштрихованная область на рис. 2). Два производных гемоглобина – оксигемоглобин и метгемоглобин имеют одинаковое поглощение на этой длине волн (изобистическая точка), поэтому результат фотометрирования не зависит от относительного содержания этих производных в растворе. Поглощение же третьим производным – карбоксигемоглобином больше на величину  $(0,97-0,84)/0,84 \times 100 = 15,4\%$  (при 100% содержании карбоксигемоглобина в крови). В таблице представлены данные о методической ошибке при различном процентном содержании карбоксигемоглобина и сопутствующих симптомах отравления угарным газом.

Таким образом, в подавляющем большинстве случаев этот модифицированный метод Дервиза-Воробьева дает приемлемый для практики результат. Он реализован в гемоглобинометре "МиниГЕМ-523", имеющем узкополосный светофильтр с максимумом пропускания при 523 нм. Методическая точность определения гемоглобина на гемоглобинометрах "МиниГЕМ-523" не превышает 1,5%, если концентрация карбоксигемоглобина в крови не превышает 10%.

### Ошибки преобразования гемоглобина

При подготовлении биопроб гемиглобинцианида и гемихрома также возникают ошибки, связанные с точностью (повторяемостью) преобразования производных, с чистотой и прозрачностью растворов, величиной pH.

О точности преобразования можно судить по калибровочным растворам гемиглобинцианида и гемихрома. Согласно паспортным данным, предельная точность составляет для этих растворов 2%. Поскольку технология определения гемоглобина (для этих методов) подобна технологии приготовления калибровочных растворов, точность определения не превышает 2%.

### Приборные ошибки

К основной приборной ошибке можно отнести точность установки оптического нуля, который играет фундаментальную роль в фотометрических измерениях. Относительно этой величины оптической плотности определяется плотность растворов. При исследовании Нв устанавливается оптический ноль – плотность холостой пробы или дистиллированной воды, налитых в абсолютно чистую кювету. Если установка нуля произведена с загрязненной кюветой, то ошибка измерений может быть абсолютно неприемлемой. Избежать этой ошибки можно только тщательной и аккуратной работой с прибором и кюветой. Другие причины, такие как загрязнение оптического канала фотометра, изменение яркости источника света при изменении или тока электрического питания, или внешней температуры, также приводят к изменению уровня оптического нуля. В этом случае необходимо как можно чаще проверять уровень оптиче-

**Таблица.** Относительная ошибка измерения концентрации гемоглобина.

% НbCO в крови	Симптомы отравления угарным газом	Ошибка, %
до 5%	Курение	0-0,75
10	Симптомов нет	1,5
10-20	Напряжение во лбу, расширение кожных сосудов	1,5-3
20-30	Головная боль и пульс в висках	3-4,5
30-40	Резкая головная боль, усталость, головокружение, ослабленное зрение, тошнота, рвота, упадок сил	4,5-6
40-50	Резкая головная боль, усталость, головокружение, ослабленное зрение, тошнота, рвота, упадок сил плюс учащенный темп дыхания и удушье	6-7,5
50-60	Кома, конвульсии, дыхание Cheyne-Stokes	7,5-9
60-70	Кома, конвульсии, слабое дыхание и пульс, возможна смерть	9-10,5
70-80	Замедление и остановка дыхания, смерть через несколько часов	10,5-12

ского нуля, что крайне неудобно при рутинных исследованиях. Эти недостатки отсутствуют в двух лучевых спектрофотометрах, где уровень оптического нуля поддерживается в опорном канале. Однако такое оборудование и дорого и неудобно для рутинных исследований. Лишены таких недостатков также гемоглобинометры "МиниГЕМ-540" и "МиниГЕМ-523", в которых уровень оптического нуля поддерживается автоматически, при помощи микропроцессора, периодически измеряющего электрооптические параметры приборов (автокалибровка) и повышающего, тем самым, точность измерений.

### Ошибки калибровки приборов

Для тех приборов, которые калибруются с помощью калибровочных растворов, к приборным ошибкам добавляется ошибка калибровки. Эта ошибка обусловлена точностью приготовления калибровочных растворов и может составлять 1-6% в зависимости от знаков ошибок (плюс или минус) калибровочных растворов разной концентрации.

### Ошибки дозирования крови и растворов

Источником ошибок дозирования является некалиброванные дозаторы и низкая квалификация лаборантов. Кроме того, имеет значение личный опыт лаборанта. Достижимая точность дозирования составляет 1%.

### Контрольные материалы и их точностные характеристики

Для каждого метода выпускаются реагенты и контрольные материалы.

Для гемихромного метода фирмой "Вектор-Бест", Новосибирск выпускаются наборы реагентов «Гемоглобин-Ново» и калибровочные растворы «Гемосо-Ново».

Линейная область определения концентрации гемоглобина – 30-180 г/л, отклонение от линейности не более 2%. Чувствительность определения – не более 25 г/л. Время реакции – 5 мин. Окраска растворов устойчива до 5 часов. Фотометрирование на длине волн 540 нм (рис. 1).

В состав набора «Гемосо-Ново» входят 4 ампулы по 5 мл калибровочных растворов гемихрома, соответствующих концентрациям гемоглобина от 50 до 190 г/л +/- 2%, коэффициент вариации 2%. Для гемиглобинцианидного метода фирмой «Ренам», Москва выпускается реагент «Диагем-Т». Время реакции – 30 мин. Область линейности 50-200 г/л, отклонение от линейности – 2%. Чувствительность 2,5 г/л. Фотометрирование на длине волн 540 нм (рис. 1).

Набор калибровочных растворов гемиглобинцианида этой же фирмы «Ренам» предназначен для калибровки фотометров. На-

бор содержит 4 ампулы по 5 мл раствора с концентрациями 50, 10, 150, 200 г/л +/- 2% при коэффициенте вариации 2%. После вскрытия ампулы раствор пригоден для использования в течение 8 часов. При производстве калибровочных растворов гемиглобинцианида фирма «Ренам» использует в качестве стандарта раствор гемиглобинцианида, который выпускает National Institute of Public Health and the Environment, Голландия. Точность этого стандарта 0,2%.

Трансформирующим раствором при модифицированном методе Дервиза-Воробьева является слабый 0,04% раствор аммиака. Набор контрольных растворов гемоглобина «Диагем-К» включает в себя растворы с концентрациями в диапазонах 70-90, 110-130 и

140-180 г/л при точности 2% и вариации также 2%. Время реакции – 1-2 секунды. После суток хранения оксигемоглобин начинает переходить в метгемоглобин, что не меняет поглощение на рабочей длине волн 523 нм, и, следовательно, измеряемую концентрацию гемоглобина.

Этот метод реализован на гемоглобинометре «МиниГЕМ-523». Для контроля калибровки прибора пригоден «Контрольный раствор гемоглобина для негемиглобинцианидных методов исследования гемоглобина» «Калибратор-Ренам» фирмы «Ренам». Контрольное значение концентрации находится в пределах 15-170 г/л. с точностью 2% при коэффициенте вариации 2%.

### Суммарная ошибка измерений

Исходя из приведенных выше точностных параметров реагентов и калибровочных растворов, а также методических ошибок измерений, можно оценить ошибку определения каждым из описанных методов.

Введем обозначения:

$\sigma_1$  – совокупная методическая ошибка.

$\sigma_2$  – ошибки преобразования гемоглобина при приготовлении биопробы для фотометрирования.

$\sigma_3$  – ошибка, связанная точностью установки оптического нуля.

$\sigma_4$  – ошибка, связанная со стабильностью электрооптических параметров.

$\sigma_5$  – ошибка калибровки.

$\sigma_6$  – ошибка дозирования, эта ошибка присутствует как при дозировании крови, так и реагента, поэтому ее нужно учитывать с двойным весом. Выше мы говорили, что в хорошем случае  $\sigma_6 \approx 1\%$ .

$\sigma_7$  – ошибка контрольных растворов гемоглобина.

Рассмотрим случай гемихромного или гемиглобинцианидного метода с использованием в качестве фотометра спектрофотометра (СФ-46, СФ-50). В спектрофотометрах можно установить узкую спектральную полосу  $\Delta\lambda \approx 1$  нм, поэтому можно принять  $\sigma_1=0$ . В этих приборах измерения можно проводить относительно опорной (холостой пробы). Если кюветы, в которые наливаются измерительная и ходовая пробы абсолютно одинаковы (по оптическому поглощению стенок и по оптической длине, то тогда можно принять  $\sigma_3=0$ ,  $\sigma_4=0$ ).

Если измерения проводятся по фактору (формула 1)  $\sigma_5=0$ , и, если считать приведенные ошибки независимыми, то суммарная ошибка (B) будет:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_2)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{2^2 + 1^2} = \sqrt{5} = 2,23(\%) \quad (3)$$

Полученный результат удовлетворяет биологически обоснованным нормам аналитической точности определенным приказом № 45.

Если измерения проводятся по калибратору (формула 2)  $\sigma_5=2\%$  и суммарная ошибка (B) станет:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_2)^2 + (\sigma_5)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{2^2 + 2^2 + 1^2} = \sqrt{9} = 3,00(\%) \quad (4)$$

что уже превышает биологически обоснованные нормы аналитической точности.

Таким образом, максимальная точность достигается на спектрофотометрах при измерении в узкой спектральной полосе по формуле 1. Использование калибраторов в спектрофотометрах может ухудшить точность измерений.

«МиниГЕМ-540» (гемоглобинцианидный метод) содержит светофильтр с полосой пропускания  $\sigma=30$  нм, поэтому  $\sigma_1=1\%$  (нелинейность). Прибор имеет встроенную схему микропроцессорного контроля оптического нуля, т.е.  $\sigma_3=0$ ,  $\sigma_4=0$ . Прибор измеряет оптическую плотность гемиглобинцианида с автоматическим пересчетом в концентрацию гемоглобина и никакие калибраторы при измерении не используются (измерение по формуле 1). Для гемоглобинометра «МиниГЕМ-540» получим следующую оценку точности:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_1)^2 + (\sigma_2)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{1^2 + 2^2 + 1^2} = \sqrt{6} = 2,45(\%) \quad (5)$$

Это удовлетворяет биологически обоснованным нормам аналитической точности.

Для гемоглобинометра «МиниГЕМ-523» при оценке точности необходимо учесть данные таблицы 1. Для большинства клинических случаев концентрация карбоксигемоглобина не превышает 10% и  $\sigma_1 = 1,5\%$ . Оценка суммарной ошибки для этого случая:

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_1)^2 + (\sigma_2)^2 + (\sigma_6)^2} = \sqrt{1,5^2 + 2^2 + 1^2} = \sqrt{7,25} = 2,69(\%) \quad (5)$$

Таким образом, модифицированный метод Дервиза-Воробьевы по точности практически совпадает и гемиглобинцианидным и гемихромным методами, если в них измерения проводить на спектрофотометрах по калибратору.

Заметим, что выше приведена оценка максимальной точности. Если измерения проводятся в грязной кювете (недопустимы даже следы пальцев!), или используемый прибор не стабилен в течение измерений, то допущение что  $\sigma_3=0$ ,  $\sigma_4=0$  несправедливо и ошибки измерений возрастают многократно.

Заметим также, что существенную долю суммарной ошибки составляют ошибки калибровки и реагентов.

Кроме того, трудно «удержать» предельную точность дозирования. Последнее обстоятельство склоняет многих к идеи использовать контрольные растворы гемоглобина или образцы контрольной крови для «сквозной» калибровки системы дозатор-кровь-дозатор-реагент-прибор. Считается, что в этом случае можно «подстроиться» к ошибкам дозировки, калибруя фотометр по образцам гемиглобинцианида, полученным из калибровочных образцов гемоглобина. Однако в этом случае можно снизить значение смещения (B), но вариационная ошибка (CV) таким образом не устранится.

Проведем аналогичную оценку минимальной ошибки (B) для «сквозной» калибровки с учетом точности контрольных растворов  $\sigma_7 = 2\%$ :

$$\sigma = \sqrt{(\sigma_2)^2 + (\sigma_7)^2} = \sqrt{2^2 + 2^2} = \sqrt{8} = 2,83(\%) \quad (7)$$

Это не лучший результат. В случае не слишком качественных приборов, у которых величины  $\sigma_1$ ,  $\sigma_3$ ,  $\sigma_4$ ,  $\sigma_5$  имеют большие значения кроется опасность того, что выявить ошибку в системе, где все может быть одновременно плохо, нельзя. Поэтому то, что можно проверить, лучше проверить и откалибровать независимо. В первую очередь можно и нужно проверить фотометр. Тогда в системе дозатор-кровь-дозатор-реагент-прибор уже есть априори точное звено и ошибку нужно будет искать вне этого звена. Это важно для каждой КДЛ, так как избавит ее от претензий со стороны метрологов.